

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-046077

(43)Date of publication of application : 20.02.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12N 5/10
C12N 9/10
C12Q 1/68
// (C12N 9/10
C12R 1:91)

(21)Application number : 11-317816

(71)Applicant : SEIKAGAKU KOGYO CO LTD

(22)Date of filing : 09.11.1999

(72)Inventor : NAKAYAMA ATSUSHI
KATSUYAMA TSUTOMU
FUKUDA MINORU

(30)Priority

Priority number : 11157190 Priority date : 03.06.1999 Priority country : JP

(54) N-ACETYLGLUCOSAMINE TRANSFERASE AND DNA ENCODING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new N-acetylglucosamine transferase which exhibits the activity that transfers N-acetylglucosamine to a galactose residue present in the nonreducing terminal of N-acetylglucosamine receptor sugar chain by α 1,4-linkage from a N-acetylglucosamine donor.

SOLUTION: This is a new N-acetylglucosamine transferase, which exhibits the activity that transfers N-acetylglucosamine to a galactose residue present in the nonreducing terminal of N-acetylglucosamine receptor sugar chain by α 1,4-linkage from a N-acetylglucosamine donor, and is useful in a method for detecting gastric carcinoma or pancreatic carcinoma and a kit for diagnosing it. The transferase is obtained by cloning a gene from the cDNA library of the human stomach tissue by PCR method using an oligonucleotide primer prepared either by utilizing the transferase activity as a marker or on the basis of the sequence, integrating the resultant gene into an expression vector, transducing it into the host cell to transfer and cultivating the transformant.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

23.10.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-46077

(P 2 0 0 1 - 4 6 0 7 7 A)

(43) 公開日 平成13年2月20日 (2001. 2. 20)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード' (参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA A 4B024
5/10		9/10	4B050
9/10		C12Q 1/68	A 4B063
C12Q 1/68		C12N 5/00	B 4B065
//(C12N 9/10			

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全21頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-317816	(71) 出願人	000195524 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号
(22) 出願日	平成11年11月9日 (1999. 11. 9)	(72) 発明者	中山 淳 長野県松本市県一丁目9-2 あがた住宅 301
(31) 優先権主張番号	特願平11-157190	(72) 発明者	勝山 努 長野県松本市大手二丁目4-13
(32) 優先日	平成11年6月3日 (1999. 6. 3)	(72) 発明者	福田 穰 アメリカ合衆国 カリフォルニア サンデ イエゴ パッシーアベニュー2818
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	100089244 弁理士 遠山 勉 (外2名)

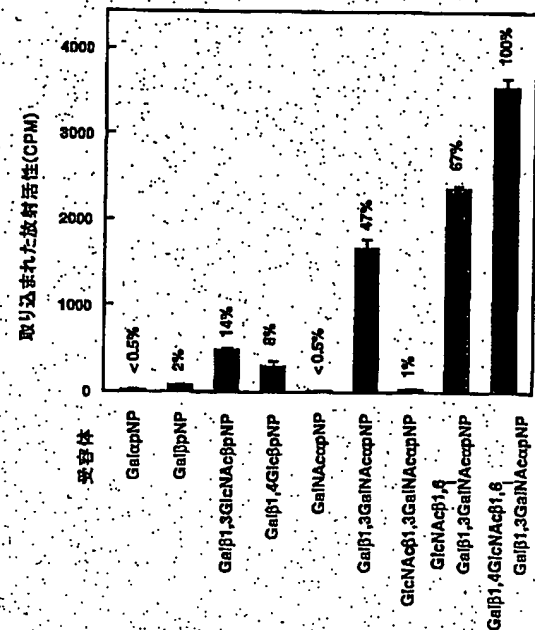
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N-アセチルグルコサミン転移酵素及びそれをコードするDNA

(57) 【要約】

【課題】 ガラクトース残基に対して α 1,4結合でN-アセチルグルコサミンを結合する活性を有する酵素を提供する。

【解決手段】 N-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを α 1,4結合により転移するN-アセチルグルコサミン転移酵素のポリペプチドをコードするDNAが導入されており、かつ該DNAが発現可能な形質転換体を培地で培養し、前記DNAがコードするポリペプチド又はそれを含むN-アセチルグルコサミン転移酵素を培養物中に生成蓄積させ、その培養物からポリペプチド又はそれを含むN-アセチルグルコサミン転移酵素を採取する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有するN-アセチルグルコサミン転移酵素。

活性：N-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを $\alpha 1, 4$ 結合により転移する。

【請求項2】 N-アセチルグルコサミン供与体がN-アセチルグルコサミン残基を有する糖ヌクレオチドであって、N-アセチルグルコサミン受容体がガラクトース-Y（但し、-はグリコシド結合、YはN-アセチルヘキソサミン、N-アセチルヘキソサミンを非還元末端に有する糖鎖、又はアグリコンが結合したN-アセチルヘキソサミンを示す）である請求項1記載のN-アセチルグルコサミン転移酵素。

【請求項3】 さらに下記の理化学的性質を有する請求項1又は2記載のN-アセチルグルコサミン転移酵素。

N-アセチルグルコサミン供与体：

UDP-N-アセチルグルコサミン（UDPはウリジン二リン酸を示す）

基質特異性：N-アセチルグルコサミン供与体から、下記①～⑤のいずれかの受容体の非還元末端のガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを転移する。

①Gal β 1, 3GalNAc α pNP

②GlcNAc β 1, 6(Gal β 1, 3)GalNAc α pNP

③Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 6(Gal β 1, 3)GalNAc α pNP

④Gal β 1, 4Glc β pNP

⑤Gal β 1, 3GlcNAc β pNP

（式中、Galはガラクトース残基、Glcはグルコース残基、GalNAcはN-アセチルガラクトサミン残基、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基、pNPはp-ニトロフェノール残基を示す）

活性化及び阻害：Mn²⁺により活性が促進される。EDTAにより活性が抑制される。

【請求項4】 以下の(a)又は(b)のポリペプチド。

(a)少なくとも配列番号2のアミノ酸配列においてアミノ酸番号96～340のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(b)(a)のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは転移したアミノ酸配列からなり、かつN-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを $\alpha 1, 4$ 結合により転移する活性を有する酵素を構成するか、又は(a)のポリペプチドと同一の抗原性を有するポリペプチド。

【請求項5】 配列番号2のアミノ酸配列の一部を含み、かつN-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを $\alpha 1, 4$ 結合

により転移する活性を有する酵素を構成するか、又は配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同一の抗原性を有するポリペプチド。

【請求項6】 N-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを $\alpha 1, 4$ 結合により転移する活性を有するN-アセチルグルコサミン転移酵素を構成するポリペプチドをコードするDNA。

10 【請求項7】 N-アセチルグルコサミン転移酵素が下記の理化学的性質を有する請求項6記載のDNA。

N-アセチルグルコサミン供与体：

UDP-N-アセチルグルコサミン（UDPはウリジン二リン酸を示す）

基質特異性：N-アセチルグルコサミン供与体から、下記①～⑤のいずれかの受容体の非還元末端のガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを転移する。

①Gal β 1, 3GalNAc α pNP

②GlcNAc β 1, 6(Gal β 1, 3)GalNAc α pNP

20 ③Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 6(Gal β 1, 3)GalNAc α pNP

④Gal β 1, 4Glc β pNP

⑤Gal β 1, 3GlcNAc β pNP

（式中、Galはガラクトース残基、Glcはグルコース残基、GalNAcはN-アセチルガラクトサミン残基、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基、pNPはp-ニトロフェノール残基を示す）

活性化及び阻害：Mn²⁺により活性が促進される。EDTAにより活性が抑制される。

【請求項8】 以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードするDNA。

(a)少なくとも配列番号2のアミノ酸配列においてアミノ酸番号96～340のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(b)(a)のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは転移したアミノ酸配列からなり、かつN-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを $\alpha 1, 4$ 結合により転移する活性を有する酵素を構成するか、又は(a)のポリペプチドと同一の抗原性を有するポリペプチド。

【請求項9】 配列番号2のアミノ酸配列の一部を含み、かつN-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを $\alpha 1, 4$ 結合により転移する活性を有する酵素を構成するか、又は配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同一の抗原性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項10】 (a)のポリペプチドが配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドである請求項8記載の

DNA。

【請求項11】 配列番号1の塩基配列において塩基番号181～1200の塩基配列を有するDNA。

【請求項12】 請求項6～11いずれか一項記載のDNAまたはそのDNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項13】 請求項6～11いずれか一項記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項14】 請求項6～11いずれか一項記載のDNAが導入されており、かつ該DNAが発現可能な形質転換体。

【請求項15】 請求項13記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項16】 請求項14又は15記載の形質転換体を培地で培養し、前記DNAがコードするポリペプチド又はそれを含むN-アセチルグルコサミン転移酵素を培養物中に生成蓄積させ、その培養物からポリペプチド又はそれを含むN-アセチルグルコサミン転移酵素を採取することを特徴とする、ポリペプチド又はそれを含むN-アセチルグルコサミン転移酵素の製造方法。

【請求項17】 生体から採取した体液中における請求項6～12のいずれか1項に記載のDNAの発現量と、胃癌又は肺癌とを関連づけることを特徴とする、胃癌又は肺癌の検出法。

【請求項18】 体液が血液である請求項17に記載の検出法。

【請求項19】 請求項6～12のいずれか1項に記載のDNAの発現を検出するためのオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする胃癌又は肺癌の診断キット。

【請求項20】 更に、逆転写酵素及びDNAポリメラーゼを含む、請求項19記載の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ガラクトースに対して $\alpha 1, 4$ 結合でN-アセチルグルコサミンを転移する酵素及びそれをコードするDNA、並びに、それらに基づく胃癌又は肺癌の検出法及び診断キットに関する。

【0002】

【従来の技術】従来、非還元末端にガラクトース残基を有する糖鎖受容体の当該ガラクトース残基に対してN-アセチルグルコサミンを付加する酵素としては、 $\beta 1, 6$ -N-アセチルグルコサミン転移酵素 (IGnT: Genes Dev., 7, 468, 1993) などが知られていたが、上記ガラクトース残基に対して $\alpha 1, 4$ 結合でN-アセチルガラクトサミンを結合する酵素の存在は確認されていなかった。

【0003】人工的に多様な糖鎖を合成し、その糖鎖が有する生理活性を解明することは新たな医薬の創製にもつながるが、ガラクトース残基に対して $\alpha 1, 4$ 結合でN-アセチルグルコサミンが結合した構造の糖鎖を酵素的に製造することは不可能であった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、受容体糖鎖の非還元末端のガラクトース残基に対して $\alpha 1, 4$ 結合でN-アセチルグルコサミンを結合する活性を有する酵素及びそれをコードするDNA並びにそれらの利用法を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を鑑み、ガラクトース残基に対して $\alpha 1, 4$ 結合でN-アセチルグルコサミンを結合する活性を有する酵素を鋭意探索した結果、驚くべきことにヒトの胃組織において、目的の活性を有する酵素が発現していることを見だし、さらに、当該組織を形成する細胞より得られた遺伝子の転写産物より、当該目的の酵素をコードするDNAを得ることに成功した。この知見に基づき本発明は完成された。

【0006】従って、本発明の第一の要旨は下記の理化学的性質を有するN-アセチルグルコサミン転移酵素（以下、本発明酵素ともいう）である。

活性：N-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを $\alpha 1, 4$ 結合により転移する。

【0007】本発明酵素において、N-アセチルグルコサミン供与体がN-アセチルグルコサミン残基を有する糖ヌクレオチドであって、N-アセチルグルコサミン受容体がガラクトース-Y（但し、-Yはグリコシド結合、YはN-アセチルヘキソサミン、N-アセチルヘキソサミンを非還元末端に有する糖鎖、又はアグリコンが結合したN-アセチルヘキソサミンを示す）であることが好ましい。

【0008】本発明酵素は、さらに下記の理化学的性質を有することが好ましい。

N-アセチルグルコサミン供与体：

UDP-N-アセチルグルコサミン（UDPはウリジン二リン酸を示す）

基質特異性：N-アセチルグルコサミン供与体から、下記①～⑤のいずれかの受容体の非還元末端のガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを転移する。

①Gal $\beta 1, 3$ GalNAc α pNP

②GlcNAc $\beta 1, 6$ (Gal $\beta 1, 3$)GalNAc α pNP

③Gal $\beta 1, 4$ GlcNAc $\beta 1, 6$ (Gal $\beta 1, 3$)GalNAc α pNP

④Gal $\beta 1, 4$ Glc β pNP

⑤Gal $\beta 1, 3$ GlcNAc β pNP

（式中、Galはガラクトース残基、Glcはグルコース残基、GalNAcはN-アセチルガラクトサミン残基、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基、pNPはp-ニトロフェノール残基を示す）

活性化及び阻害：Mn²⁺により活性が促進される。EDTAにより活性が抑制される。

【0009】また、本発明の第二の要旨は本発明酵素のポリペプチド（以下、本発明ポリペプチドともいう）で

ある。本発明ポリペプチドは、以下の(a)又は(b)のポリペプチドである。

(a)少なくとも配列番号2のアミノ酸配列においてアミノ酸番号96～340のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(b) (a)のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは転移したアミノ酸配列からなり、かつN-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを α 1,4結合により転移する活性を有する酵素を構成するか、又は(a)のポリペプチドと同一の抗原性を有するポリペプチド。

【0010】本発明ポリペプチドは、好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列の一部を含み、かつN-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを α 1,4結合により転移する活性を有する酵素を構成するか、又は配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同一の抗原性を有するものである。

【0011】またさらに、本発明の第三の要旨は上記のポリペプチドをコードするDNA（以下、本発明DNAともいう）である。本発明DNAは、N-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを α 1,4結合により転移する活性を有するN-アセチルグルコサミン転移酵素を構成するポリペプチドをコードする。

【0012】本発明DNAにおいては、N-アセチルグルコサミン転移酵素が下記の理化学的性質を有することが好ましい。

N-アセチルグルコサミン供与体：

UDP-N-アセチルグルコサミン（UDPはウリジン二リン酸を示す）

基質特異性：N-アセチルグルコサミン供与体から、下記①～⑤のいずれかの受容体の非還元末端のガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを転移する。

①Gal β 1,3GalNAc α pNP

②GlcNAc β 1,6(Gal β 1,3)GalNAc α pNP

③Gal β 1,4GlcNAc β 1,6(Gal β 1,3)GalNAc α pNP

④Gal β 1,4Glc β pNP

⑤Gal β 1,3GlcNAc β pNP

（式中、Galはガラクトース残基、Glcはグルコース残基、GalNAcはN-アセチルガラクトサミン残基、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基、pNPはp-ニトロフェノール残基を示す）

活性化及び阻害：Mn²⁺により活性が促進される。EDTAにより活性が抑制される。

【0013】本発明DNAは、好ましくは、以下の(a)

又は(b)のポリペプチドをコードする。

(a)少なくとも配列番号2のアミノ酸配列においてアミノ酸番号96～340のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(b) (a)のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは転移したアミノ酸配列からなり、かつN-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを α 1,4結合により転移する活性を有する酵素を構成するか、又は(a)のポリペプチドと同一の抗原性を有するポリペプチド。

【0014】好ましくは、上記(a)のポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

【0015】本発明DNAは、また、好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列の一部を含み、かつN-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを α 1,4結合により転移する活性を有する酵素を構成するか、又は配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同一の抗原性を有するポリペプチドをコードする。

【0016】本発明DNAとしては、配列番号1の塩基配列において塩基番号181～1200の塩基配列を有するものが挙げられる。

【0017】本発明はさらに、本発明DNAまたはそのDNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするポリヌクレオチド、本発明DNAを含む組換えベクター、本発明DNAが導入されており、そのDNAが発現可能な形質転換多体（例えば、本発明DNAを含む組換えベクターを含む形質転換体）、及び、この形質転換体を培地で培養し、前記DNAがコードするポリペプチド又はそれを含むN-アセチルグルコサミン転移酵素を培養物中に生成蓄積させ、その培養物からポリペプチド又はそれを含むN-アセチルグルコサミン転移酵素を採取することを特徴とする、ポリペプチド又はそれを含むN-アセチルグルコサミン転移酵素の製造方法も提供する。

【0018】また、本発明は、本発明DNAの発現に基づく胃癌又は肝癌の検出法（以下、本発明検出法ともいう）を提供する。好ましい態様の検出法は、生体から採取した体液中における本発明DNAの発現量、好ましくは転写産物量と、胃癌又は肝癌とを関連づけることを特徴とする。体液は好ましくは血液である。

【0019】さらに、本発明は、本発明DNAの発現を検出するためのオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする胃癌又は肝癌の診断キット（以下、本発明診断キットともいう）を提供する。この診断キットは、更に、逆転写酵素及びDNAポリメラーゼを含むことが好まし

い。

【0020】

【発明の実施の形態】以下、本発明を発明の実施の形態により詳説する。

【0021】<1>本発明酵素、本発明ポリペプチド及び本発明DNA

本発明酵素（以下、「 $\alpha 4\text{GnT}$ 」とも略記する）は、受容体糖鎖の非還元末端のガラクトース残基に対して $\alpha 1,4$ 結合でN-アセチルグルコサミンを転移する。本発明酵素は、上記活性を有するものである限り、その由来は限定されるものではないが、哺乳類由来であることが好ましく、ヒト由来であることが特に好ましい。

【0022】本発明酵素には、以下のような理化学的性質を有する $\alpha 4\text{GnT}$ が包含される。

活性：N-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を $\alpha 1,4$ 結合により転移する（以下、この酵素活性を「本酵素活性」ともいう）。N-アセチルグルコサミン供与体は、N-アセチルグルコサミン残基を有する糖ヌクレオチドであることが好ましく、具体的にはX-N-GlcNAc（但し、XはADP、CDP、UDP、又はGDPを示す）が挙げられ、最も好ましいものはUDP-GlcNAcである。N-アセチルグルコサミン受容体はガラクトース-Y（但し、-はグリコシド結合、YはN-アセチルヘキソサミン、N-アセチルヘキソサミンを非還元末端に有する糖鎖、又はアグリコンが結合したN-アセチルヘキソサミンを示す）であることが好ましい。N-アセチルヘキソサミンとしては、特にN-アセチルガラクトサミン又はN-アセチルグルコサミンが好ましい。また、アグリコンとはN-アセチルヘキソサミンにグリコシド結合した非糖質部分であり、例えば脂肪族化合物、芳香族化合物、アルカロイド、脂質等が挙げられ、特に限定はされないが、より具体的にはp-ニトロフェノール等が挙げられる。

【0023】本発明酵素は、好ましくは、さらに下記の理化学的性質を有する。

N-アセチルグルコサミン供与体：

UDP-N-アセチルグルコサミン（UDPはウリジン二リン酸を示す）

基質特異性：N-アセチルグルコサミン供与体から、下記①～⑤のいずれかの受容体のガラクトース残基にGlcNAcを転移する。

①Gal $\beta 1,3$ GalNAc α pNP

②GlcNAc $\beta 1,6$ (Gal $\beta 1,3$)GalNAc α pNP

③Gal $\beta 1,4$ GlcNAc $\beta 1,6$ (Gal $\beta 1,3$)GalNAc α pNP

④Gal $\beta 1,4$ Glc β pNP

⑤Gal $\beta 1,3$ GlcNAc β pNP

活性化及び阻害： Mn^{2+} により活性が促進される。EDTAにより活性が抑制される。

【0024】ここで、活性が促進されるとは、pH 7.0、

37℃の条件で5 mMの Mn^{2+} により非添加時と比して活性が1.2倍以上、好ましくは1.3倍以上になることを意味する。また、活性が抑制されるとは上記条件で10 mMのEDTAにより非添加時と比して活性が3分の2以下、好ましくは2分の1以下になることを意味する。

【0025】本発明ポリペプチドは、以下の(a)又は(b)のポリペプチドである。

(a)少なくとも配列番号2のアミノ酸配列においてアミノ酸番号96～340のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

(b)(a)のポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは転移したアミノ酸配列からなり、かつN-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にN-アセチルグルコサミンを $\alpha 1,4$ 結合により転移する活性を有する酵素を構成するか、又は(a)のポリペプチドと同一の抗原性を有するポリペプチド。

【0026】ここで、「酵素を構成する」とは、ポリペプチドがそれ自体で目的の酵素活性を有するか、又は糖鎖の付加等のように他の物質と複合化することによって、目的とする酵素活性を有する場合に用いる。

【0027】好ましくは、上記(a)のポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

【0028】本発明ポリペプチドは、また、好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列の一部を含み、かつN-アセチルグルコサミン供与体から、N-アセチルグルコサミン受容体有する糖鎖の非還元末端に存在するガラクトース残基にGlcNAcを $\alpha 1,4$ 結合により転移する活性を有する酵素を構成するか、又は配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドと同一の抗原性を有するものである。配列番号2のアミノ酸配列の一部としては、例えばアミノ酸番号28～340、61～340、87～340又は96～340が挙げられる。

【0029】本発明DNAには、本発明ポリペプチドをコードしているものが包含され、これらのポリペプチドをコードしているのであればその塩基配列は特に限定されない。

【0030】配列番号2のアミノ酸配列又はその部分配列を有するポリペプチドは、本酵素活性を有する酵素を構成するポリペプチドであり、本酵素活性を実質的に害さない1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよく、そのようなアミノ酸配列の置換、欠失、挿入又は転位を有するポリペプチドをコードする、塩基配列の置換、欠失、挿入及び転位を有するDNAのいずれもが本発明DNAに包含される。本明細書における「アミノ酸の数個」とは当該酵素の活性が失われない程度の変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、例えば340アミノ酸残基からなるポリペプチド

ドの場合、50程度以下の数を示す。

【0031】本酵素活性の測定法は公知の方法 (J. Bio. Chem. 274, 3215-3221, 1999) において、宿主細胞に導入するcDNAと酵素の基質を α 4GnTのものに変更し、反応液中のEDTAを5 mMのMnCl₂に変更することによって容易に行うことが可能であり、例えば本明細書において具体的に示した方法により当業者であれば容易に実施可能であるため、目的とする酵素活性の有無を指標として、該活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を容易に選択することができる。DNAの塩基配列の変異(置換、欠失、挿入又は転位)は、両末端に制限酵素切断末端を持ち、変異点の両側を含む配列を合成し、未変異DNAが有する塩基配列の相当する部分と入れ換えることにより、DNAに導入することができる。また、部位特異的変異法 (Kramer, W. and Frits, H. J., Meth. in Enzymol., 154, 350(1987); Kunkel, T.A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367(1987)) などの方法によっても、DNAに置換、欠失、挿入又は転位を導入することができる。

【0032】同一活性を有する酵素タンパク質のアミノ酸配列には、種間や個体間において活性に影響を与えないアミノ酸配列の相違があり得ること(同等の活性の変異体が存在し得ること)が当然に予想される。従って上記の活性を実質的に害さない1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位は、種間あるいは個体間変異程度の範囲内であることが好ましい。

【0033】また、ポリペプチドの抗原性の異同は公知の免疫学的方法で決定することができる。

【0034】本発明DNAとして具体的には配列番号2のアミノ酸配列においてアミノ酸番号1~340、28~340、61~340、87~340又は96~340のアミノ酸配列の全てをコードする塩基配列又はその部分塩基配列を有するDNAが挙げられ、かつ好ましいがこれに限定はされない。上記の「部分塩基配列を有するDNA」とは、例えば α 4GnTのポリペプチドをコードするDNAとハイブリダイズし α 4GnTのDNAを検出するためのプローブとして使用することができる又はコードされるポリペプチドが α 4GnT活性を有するあるいは α 4GnTと同様の抗原性を有するDNAを示す。本発明は、このような本発明DNAまたはそのDNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするポリヌクレオチド(例えば、DNA、RNA)を提供する。上記ハイブリダイズは、一般にスクリーニング等においてDNA又はRNAとDNAをハイブリダイズさせる際に用いられている方法によって行えばよく、例えば、DNAのスクリーニングなどに使用される条件としては、50%ホルムアミド、5×SSPE(塩化ナトリウム/リン酸ナトリウム/EDTA緩衝液)、5×デンハルト溶液(Denhardt's solution)、0.5% SDSと50 μ g/mlの変性させたサケ精子DNAを含む溶

液中で目的DNAをプレハイブリダイズし、³²Pラベルした本発明DNA(例えば配列番号1記載の塩基配列を有するDNA)を添加し、42℃で16時間ハイブリダイズさせた後、55℃で1×SSPE、1% SDS、さらに0.1×SSPE、0.1% SDSにより洗浄することが挙げられる。一般的なハイブリダイズは上述のような条件下で行われることが多いが、当業者であれば同様のハイブリダイズを目的として各溶液の組成や詳細な条件を変更することにより同様のハイブリダイズを行うことが可能であるため、同様な効果を得ることが可能な条件であれば上述の条件に特に限定はされない。

【0035】本発明DNAが有する塩基配列としてより具体的には、配列番号1に示す全塩基配列又はその部分配列を有するDNAが挙げられ、かつ好ましい。このようなDNAとして具体的には、配列番号1における塩基番号181~1200、262~1200、361~1200、439~1200又は466~1200の塩基配列からなるDNAが挙げられる。

【0036】配列番号1に示す塩基配列においては、 α 4GnTのcDNAのオープンリーディングフレームの5'末端部に4つのイン・フレームのATGコドンが含まれている。5'末端より存在する2つのATGコドンの周囲の塩基配列は、全て-3の位置のプリンが保存されている。このことは効率的な翻訳に関するKozakの知見(Kozak, M. (1986) Cell, 44, 283-292)を満足しており、また他の2つのATGコドンも+4の位置にA、Cがあって共通配列に部分的に適合しており、いずれのATGコドンも開始コドンとして機能する可能性がある。

【0037】ところで、 β 1、4-ガラクトース転移酵素は、フレーム内に2つのATGコドンを含むことが知られている(Nakazawa, K. et al. (1988) J. Biochem., 104, 165-168; Shaper, N. et al. (1988) J. Biol. Chem., 263, 10420-10428)。また、Shaperらは、 β 1、4-ガラクトース転移酵素は、2箇所からの翻訳開始の結果、長いものと短いものと両方の形態が合成されることを示している。さらに、Lopezらは、長い形態のものは原形質膜を優先的に標的とし、短い形態のものは主としてゴルジ体内に存在することを示唆する証拠を示している(Lopez, L. et al. (1991) J. Biol. Chem., 266, 15984-15991)。同様に、 α 4GnTについても、複数のATGコドンが開始コドンとして機能する可能性はあるが、定かではない。しかし、いずれのATGコドンが開始コドンであっても、上記の α 4GnTのポリペプチドをコードする点では同じであり、第2番目、第3番目、又は第4番目のATGコドンから始まる塩基配列を有するDNAも本発明に包含されるものである。従って、 α 4GnTのポリペプチドは配列番号2記載のアミノ酸配列において少なくともアミノ酸番号96~340に相当する領域を有するものである。

【0038】配列番号1の最初のATGコドンで始まる

単一のオープンリーディングフレームからは、340アミノ酸残基からなり、分子量39,497Da、N-結合型糖鎖の付く部位である可能性がある4カ所の部位を有するタンパク質が予測される。このアミノ酸配列から作成したヒドロパシープロット(図1)から、N末端から4~25番目のアミノ酸残基にわたる長さ22残基の連続した1つの顕著な疎水性部分が認められ、トランスメンブレンドメイン(膜貫通領域)を有することが予想される。

【0039】尚、遺伝暗号の縮重によって、同一アミノ酸配列をコードし、配列番号1の塩基配列とは異なった塩基配列を有するDNAも本発明DNAに包含されることは、当業者であれば容易に理解されるところである。

【0040】また、本発明DNAには、本発明DNAに相補的なDNA又はRNAも包含される。さらに本発明DNAは、ポリペプチドをコードするコード鎖のみの一本鎖であってもよく、この一本鎖およびこれと相補的な配列を有するDNA鎖又はRNA鎖からなる二本鎖であってもよい。また、本発明DNAは、翻訳前に除かれるイントロンの配列を含んでもよい。

【0041】特に配列番号1の塩基配列の部分配列又はそれに相補的な配列を有するDNA又はRNAは、組織において発現している本発明酵素を測定する際に、PCR法やin situ hybridization法によって本発明DNAの転写産物量を測定するためのプライマーやプローブとして利用可能である。前述のプライマーやプローブとしての使用に適する塩基配列は、配列番号1の塩基配列を基に適宜選択することが可能であるが、市販のコンピュータプログラム(例えばOligo version 4.0プログラム:ナショナルバイオサイエンス社製等)を使用することで効率的に設計することも可能である。

【0042】また更に、本発明DNAは、α4GnTのポリペプチド全体をコードするコード領域全長の塩基配列を有していてもよく、またα4GnTのポリペプチドの一部をコードする塩基配列を有するものであってもよい。

【0043】ところで、一般に哺乳動物の同一酵素のポリペプチドは、アミノ酸配列に高い相同性を有することが知られており、本発明DNAがコードするポリペプチドも、種間におけるアミノ酸配列の相同性は約65%以上と想定される。従って、本発明で具体的に開示しているDNAがコードするポリペプチドと高い相同性を有するポリペプチド及びそれをコードするDNAも本発明に包含される。上述のようにα4GnTのポリペプチドは膜貫通領域を有するが、膜内の末端にあたるN末端部から当該膜貫通領域を含む領域を欠失したα4GnTのポリペプチドの部分もまた本発明に包含される。このようなポリペプチドを具体的に例示すると、例えば配列番号2に示すアミノ酸配列におけるアミノ酸番号26~340などが挙げられる。

【0044】<2>本発明DNAの製造方法

以下、本発明DNAを得る方法について説明する。本発明DNAは、実施例に示すようにヒト胃組織のcDNAライブラリーから本酵素活性を指標に調製することからできる。また、本発明によりα4GnTのポリペプチドのアミノ酸配列が明らかにされたので、その配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドプライマーを用いるPCR法(ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法)によつて染色体DNAあるいはmRNAから本発明DNAを増幅することによって取得することも可能である。特に以下の各工程からなる発現クローニング法によりヒトのα4GnTをコードするDNAを製造することも可能である。

- (1) ヒトのcDNAライブラリーを宿主細胞に導入する。
- (2) 細胞表面にα結合で非還元末端にGlcNAcが結合したO-グリカンを発現した宿主細胞を検出し、回収する。
- (3) α4GnT cDNAのシブセレクションによる取得

【0045】スクリーニングによって、通常には上記α4GnTの完全長cDNAを選択する。以下に、本発明DNAを製造する方法の一例を具体的に説明する。

【0046】(1) ヒトのcDNAライブラリーの宿主細胞への導入

ヒトのcDNAライブラリーが由来する組織は、α4GnTが発現している細胞が存在する組織が好ましく、具体的には胃及び脾臓が好ましい。前記組織のcDNAライブラリーは例えばクロンテック社などから商業的に入手することも可能であり、また生検などにより生体から取り出された組織から調製することも可能である。例えば、生検によって取り出された組織から常法に従ってグアニジンチオシアネート/CsCl法(Kingston, R.E., (1991) in Current Protocols in Molecular Biology, Supple. 14, Unit 4.2, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, New York)等の公知の方法により全RNAを調製する。このようにして得られる全RNAから、オリゴdT (oligo-(dT)) セルロースカラムクロマトグラフィーなどによってポリ(A)⁺ RNAを精製することができる。

【0047】上記(A)⁺ RNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチドプライマーを用いた逆転写PCRにより、組織由来のcDNAを増幅することができる。逆転写PCRは、常法に従って行えばよいが、具体的に示すならば以下の通りである。1μgのポリ(A)⁺ RNA、それぞれ100 pmolのオリゴdTとランダムオリゴヌクレオチドプライマー、それぞれ500 μMの4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸、200単位のM-MLV逆転写酵素(ギブコBRL社製等)、1 mMジチオスレイトール(DTT)、120単位のRNase(リボスクレアーゼ)インヒビター(宝酒造(株)製等)を含む緩衝液(終量20 μl)を50℃で60分間インキュベートし、cDNA一次鎖を合成する。次の上記の逆転写反応混合液5 μl、各100 pmolのランダムオリゴヌクレオチドプライマー、それぞれ250 μMの4種類のデオキシリボヌクレオシド三リン酸、1.25単位のTaqポリメラーゼを含む反応液(終量50 μl)に対し、95℃1分、46~62℃1分及び72℃2分を

35サイクル程度繰り返して行う方法などが例示として挙げられる。

【0048】このようにして得られたヒト組織のcDNAは、発現プラスミドベクターに保持させた後、宿主細胞に導入して宿主細胞をスクリーニングするために使用される。宿主細胞としては、原核細胞及び真核細胞いずれも使用することが可能であり、当業者で有れば用いる宿主細胞にあわせてDNAの導入及び発現が可能な発現プラスミドベクターを上述の発現プラスミドベクターとして選択して使用することは容易であるが、特に真核細胞を宿主細胞として使用することが好ましく、中でも特に哺乳類由来の細胞を宿主細胞として使用することが好ましい。そのような細胞株としては例えばヒトナマルバ(Namalwa)細胞(細井ら:Cytotechnology, 1, 151, 1988)、チャイニーズハムスター由来のCHO細胞(ATCC CCL61等)、サル由来のCOS細胞(ATCC CRL1650等)、マウス由来の3LL細胞(Taniguchi, S. (信州大学加齢適応研究センター))等が挙げられる。本発明においては、特に細胞表面に α 1,4結合でガラクトースに結合したN-アセチルグルコサミンが発現していない細胞が好ましく、上述のCOS細胞の一系統であるCOS-1細胞などが好ましい。

【0049】発現プラスミドベクターとしてはpCEV18(Maruyama, K. (東京医科歯科大学))、pCXN2(Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. (Gene, 108, 193-200, 1991)、pFLAG-CMV-2 (Eastman Kodak製)、pAGE107(Miyajiら, Cytotechnology, 3, 133, 1990)、pAS3-3(特開平2-227075号公報)、pAMoERC3Sc(特開平5-336963号公報)、pcD2(Chen, C.ら, Mol. Cell. Biol., 7, 2445-2452, 1987)、pRcCMV(インビトロゲン社製)、pME18S(丸山ら, Med. Immunol., 20, 27, 1990)、及びpcDNAI(クロンテック社製)などが挙げられる。上述の宿主細胞として好ましいCOS-1細胞を使用する場合にヒトcDNAライブラリーの製造に使用するにはpcDNAIが好ましいがこれに限定されるわけではない。

【0050】上述のCOS-1などは、本発明酵素が α 1,4結合でN-アセチルグルコサミンを付加する受容体を発現していないが、そのような細胞には外的にN-アセチルグルコサミン受容体を発現するためのcDNAを上述のヒト組織のcDNAライブラリーの宿主細胞への導入と同時に導入することで細胞表面に本発明酵素の活性による産物(α 結合で非還元末端にGlcNAcが結合したO-グリカン)を発現させることが可能となる。本発明酵素の働きにおいてN-アセチルグルコサミン受容体となる物質として好ましくはヒトのロイコシアリンが挙げられ、ヒトのロイコシアリンを発現させるための遺伝子をCOS-1細胞に導入するためにはpRcCMV-leu(Fukuda, M. in Cell Surface Carbohydrates and Cell Development, 127-159, 1992)等を使用することが好ましい。

【0051】(2)細胞表面に α 結合で非還元末端にGl

cNAcが結合したO-グリカンを発現した宿主細胞の検出、回収

上記(1)でcDNAを導入した細胞は、15時間以上、好ましくは20~80時間程度通常の培養条件下において培養する。培養後、非還元末端に α 結合でGlcNAcが結合したO-グリカンを発現した細胞を回収する。

【0052】 α 結合で非還元末端にGlcNAcが結合したO-グリカンの検出は、通常はその簡略化された手法が確立されていることから抗原抗体反応を用いることが好ましい。抗原抗体反応に用いる抗体としては、GlcNAcが結合したO-グリカン、特にGlcNAc α 1,4Gal構造に特異性を有する抗体が好ましい。そのような抗体としては例えばhHK1083、PGM36、及びPGM37等(Biochem. J. 318, 409-416, 1996, Comp. Biochem. Physiol. 121B, 315-321, 1998)が挙げられ、いずれの抗体であっても使用することが可能である。また、上述の抗体はそれぞれ単独で使用することも可能であるが、上述の抗体から選択された2種類あるいは3種類すべての抗体を混合して、上述の目的の構造を検出するために使用することも可能である。

【0053】抗体が結合した細胞の検出法は、常法に従って行えばよいが、例えばラベルされた、上述の好ましい抗体に対する二次抗体を使用する方法などが挙げられる。上記二次抗体のラベルは、検出可能なラベルであってそれを指標として細胞を回収する手段が存在する前記ラベル(例えば蛍光標識ラベル(フローサイトメトリーとセルソーターにより細胞を回収可能)、特異的結合対(ビオチンとアビジンなど)の一方など(特異的結合対の他方を固相したカラムなどにより細胞を吸着、回収可能))を使用することが好ましい。特に公知の蛍光標識ラベルを結合した二次抗体を使用すると、フローサイトメトリー及びセルソーターを使用することによって、細胞の検出及び回収を容易に行うことができるため好ましい。

【0054】セルソーターでの蛍光の強い細胞の回収は、個数で細胞集団全体の20%以下、好ましくは10%以下、特に好ましくは5%以下の細胞を選別することが好ましいがこれに限定されない。回収した細胞からは、常法に則って発現プラスミドベクターを抽出することができる。

【0055】(3) α 4GnT cDNAのシブセレクションによる取得

上記の操作によって得られた発現プラスミドベクターを適当な宿主に導入して α 4GnTcDNAをシブセレクションにより取得する。シブセレクションは公知の方法によって行うことが可能であるが、E. coliなどの適当な原核細胞株(宿主菌)に上記の発現プラスミドベクターを導入し、この宿主菌を培養してコロニーを形成させ、目的のcDNAが導入されたコロニーを絞り込む方法が簡便なため好ましい。上述の好ましい発現ベクターとして例示したpcDNAIを使用する場合は、宿主菌としてE. coli MC1061

/P3を使用することができる。複数のコロニーから $\alpha 4\text{GnTcDNA}$ を含む発現プラスミドベクターが導入された宿主菌によって構成されるコロニーを選択する方法としては、例えば以下の方法があげられる。

【0056】すなわち、生じた宿主菌の複数のコロニー(宿主)をニトロセルロース膜などに転写してレプリカを作成し、当該レプリカを複数のプールに分けてそれぞれのプールから発現プラスミドベクターを常法に従って調製する。この発現プラスミドベクターを(1)に記載した方法と同様に宿主細胞に導入して培養し、目的の $\alpha 4\text{GnT}$ を発現した細胞を検出することで $\alpha 4\text{GnTcDNA}$ を含むプラスミドベクターが含まれるレプリカを特定し、それに基づいてコロニーの特定が可能である。

【0057】 $\alpha 4\text{GnT}$ を発現した宿主細胞の検出は、上記(2)と同様に、細胞表面に非還元末端に α 結合でGlcNAcが結合したO-グリカンを発現した宿主細胞を検出することにより行うことができるため、宿主細胞としてはほ乳類由来の細胞が好ましく、(1)で記載した宿主細胞が好ましい。上述のHIK1083、PGM36、及びPGM37等の抗体を使用した抗原抗体反応を利用することで上記検出を行うことが簡便となるため好ましい。

【0058】上記で $\alpha 4\text{GnT}$ の発現が検出された宿主細胞から、対応するレプリカを特定し、さらにそのレプリカの宿主を特定することができる。 $\alpha 4\text{GnTcDNA}$ は当該宿主上のコロニーに含まれる宿主菌から常法に従って取得することが可能である。

【0059】通常は、レプリカの作成、複数プールへの分割、 $\alpha 4\text{GnTcDNA}$ を含むプラスミドベクターを含むプールの選択、及び対応する宿主の選択を繰り返すことで目的の $\alpha 4\text{GnTcDNA}$ の単クローンを得ることが可能である。

【0060】目的遺伝子 $\alpha 4\text{GnTcDNA}$ を含む発現プラスミドベクターpcDNAI (pcDNAI- $\alpha 4\text{GnT}$)を常法に従ってこの単クローンから抽出し、挿入された $\alpha 4\text{GnT}$ のcDNAの塩基配列の決定を行うことができる。上述の様に得られる $\alpha 4\text{GnT}$ のcDNAの塩基配列及びこの塩基配列から予想されるアミノ酸配列としては例えば配列番号1に記載された塩基配列及び配列番号2に記載されたアミノ酸配列が挙げられる。

【0061】また、膜貫通領域を欠失した、すなわち可溶性タンパク質の形態の $\alpha 4\text{GnT}$ のポリペプチドをコードするDNAは以下のようにして得ることが可能である。すなわち、まず配列番号1に示す塩基配列に基づき、当該酵素のポリペプチドのN-末端側で適当な短縮化形態となるように選択したプライマーを合成し、クローン化した $\alpha 4\text{GnT}$ のcDNAを鋳型としてPCR法により増幅する。例えばN-末端の27アミノ酸残基が欠失した短縮化形態のポリペプチド(配列番号2のアミノ酸配列においてアミノ酸番号28~340のアミノ酸配列を有する)をコードするDNAを得る場合には、例えば目的とする塩基配列の3'

及び5'末端部に存在する塩基配列をもとにオリゴヌクレオチドプライマーを合成する。例えば配列番号3及び4に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーをそれぞれ5'プライマー及び3'プライマーとして用いてPCRを行えばよい。次いで、増幅して得られたPCR産物を必要により精製して目的DNAを得ることが可能である。

【0062】<3>本発明DNAの塩基配列によってコードされる $\alpha 4\text{GnT}$ のポリペプチドの全部又は一部からなるポリペプチド

本発明は、上記の本発明DNAによってコードされる $\alpha 4\text{GnT}$ のポリペプチドの全部又は一部からなるポリペプチドも提供する。本明細書において、上記のポリペプチドの「一部」とは、当該ポリペプチドの「一部」を有する酵素が $\alpha 4\text{GnT}$ 活性を有する、あるいは $\alpha 4\text{GnT}$ のペプチド配列の全配列と同一の抗原性を有するなどの $\alpha 4\text{GnT}$ のポリペプチド全部と共通の何らかの活性ないし機能を有する部分を意味する。本ポリペプチドは単独であっても良いし、又はポリペプチドと融合していても良い。また、膜貫通領域を欠失していても良い。膜貫通領域のみを欠失したポリペプチドとしては例えば配列番号2のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号28~340のものが挙げられる。

【0063】また、本ポリペプチドを免疫原として本発明ポリペプチド又は本発明酵素に対する抗体を常法により製造することも可能である。

【0064】具体的には、配列番号2のアミノ酸配列の全部又は一部を有し、本発明酵素に特徴的なアミノ酸配列を有する上記ポリペプチドを免疫原として、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドとは由来が異なる動物に投与することによって免疫し、常法に従ってポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を調製することができる。免疫原を免疫感作する動物は、上記免疫原によって感作されて本発明の抗体を産生できる動物であれば限定はされないが、例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ニワトリ、アヒル等が挙げられ、特にウサギ、ラット、マウス、ヤギが好適である。

【0065】動物への免疫原の投与に際し、好ましくは常法により上記免疫原とアジュバント(完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、アルミニウムアジュバント、百日咳菌アジュバントなど)との混合物(懸濁液)を調製し、これを上記動物の皮下、皮内、静脈内又は腹腔内に投与する。

【0066】初回投与後、1~5週間に一度、1~5回程度同様に追加免疫を行うと、上記免疫原に対する抗体が免疫感作された動物の体内に産生される。このように産生された抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体として常法により採取される。

【0067】<4>本発明DNAを利用した本発明ポリペプチド又は本発明酵素の製造方法

上記本発明DNAで形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、本発明DNAがコードするポリペプチド又はそれを含む α 4GnTを培養物中に生成蓄積させ、その培養物からポリペプチド又はそれを含む α 4GnTを採取することによって、ポリペプチド又はそれを含む α 4GnTを製造することができる。

【0068】本発明DNAで形質転換された細胞は、公知の発現ベクターに本発明DNAの断片を挿入して組換えベクターを構築し、この組換えベクターを用いて、細胞を形質転換することによって得ることができる。なお、本発明は、本発明DNAを保持する組換えベクターが導入されており、かつ該DNAが発現可能で、本発明酵素の製造に使用できる形質転換体（例えば、上記組換えベクターを含む形質転換体）も提供するものである。

【0069】細胞としては大腸菌などの原核細胞や、ほ乳類細胞などの真核細胞が例示される。大腸菌などの原核細胞を用いた際は、本発明DNAの発現によって生じる α 4GnTのポリペプチドに糖鎖の付加が起こらないため、純粋に α 4GnTのポリペプチドのみを得ることが可能であり、またほ乳類細胞などの真核細胞を用いた際は、本発明DNAの発現によって生じる α 4GnTのポリペプチドに糖鎖の付加がなされ、本発明酵素(α 4GnT)が製造される。

【0070】本製造方法においては、タンパク質の製造に通常用いられる宿主ベクター系を使用することができ、COS-1細胞、3LL-HK46細胞などのほ乳類由来の培養細胞とpcDNA1、pME18S、pCEV18等のほ乳類細胞用発現ベクターとの組み合わせを採用することが好ましいが、特に限定はされず、ほ乳類由来でない培養細胞と、その細胞で発現し得る発現ベクターとの組み合わせを利用して製造することができる。培地や培養条件は、用いる宿主すなわち細胞にあわせて適宜選択される。

【0071】本発明DNAによってポリペプチドの全長のみを発現させてもよいが、他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現させてもよい。また本発明DNAの一部を用いて部分ペプチドとして発現させてもよい。

【0072】上記融合ポリペプチドを発現する組換えプラスミドの構築方法の具体例としては以下の方法が挙げられる。すなわち、本発明のDNAを、挿入したDNAと同一読み出し領域にプロテインAなどのタンパク質を含むように構築した発現プラスミドベクター（例えばpGIR201p rotA: J. Biol. Chem. 269, 1394-1401, 1994, pcDNA1-A: J. Biol. Chem. 274, 3215-3221, 1999など）に通常の方法に従って組み込み、複数のタンパク質の遺伝子を同一読み出し領域に有する発現プラスミドベクターを構築し、宿主細胞に導入することができる。また、この発現プラスミドベクターから、融合タンパク質をコードする断片を制限酵素により切り出して、上記と同様の操作により他の発現プラスミドベクターに連結させて宿主細胞に導入することも可能である。

【0073】培養物からの本発明ポリペプチド又は本発

明酵素の採取は、公知のポリペプチドの精製方法によって行うことができる。具体的には例えば、本発明酵素の基質などを結合したセファロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーが挙げられる。融合ポリペプチドとして発現させた場合は、上記アフィニティークラムの他、 α 4GnTと融合したポリペプチドに対し親和性の高い物質（例えば抗体など）を結合したアフィニティークロマトグラフィー等に宿主細胞の培養物を付することによって精製することができる。さらに、融合ポリペプチド中の α 4GnTと他のタンパク質のポリペプチドとの間に、例えば特定のタンパク質分解酵素が認識して切断するアミノ酸配列を有するリンカーを予め組み込んでおくことにより、融合ポリペプチドを精製した後にリンカー部位で融合ポリペプチドを切断することにより、 α 4GnTを得ることが可能である。上記タンパク質分解酵素とそれが認識する特定の配列の組み合わせとしては、例えばプロインスリンの合成時に働くシグナルペプチダーゼとインスリンのシグナルペプチドの組み合わせが挙げられる。なお、上記の培養物には、培地及び当該培地中の細胞が包含される。

【0074】 α 4GnTの活性の測定方法としては、J. Biol. Chem. 274, 3215-3221, 1999に記載された基質特異性試験の方法において、EDTAの代わりに5 mMのMnCl₂を含む反応液を用いることにより実施することが可能である。

【0075】<5>本発明検出法

胃および脾臓の組織は癌化に伴いコンカナバリンAパラドックス染色で検出されるIII型粘液が増加することが知られている（J. Histochem. Cytochem., 46, 793-801, 1998, Hum. Pathol., 23, 925-933, Hum. Pathol., 26, 725-734, 1995）ため、組織又は血液などの体液中に存在する細胞における本発明DNAの転写産物の発現を、例えば、リアルタイムRT-PCR法、PCR法などによって定量することにより、癌の診断に利用することができる。

【0076】すなわち、生体から採取した体液における α 4GnTのDNAの発現量と、胃癌又は脾癌とを関連づけることで、胃癌又は脾癌の検出を容易に行うことが可能である。本明細書において、発現量と、胃癌又は脾癌とを関連づけるとは、発現量を、胃癌又は脾癌の有無、進行度、転移の有無、治癒の程度などの胃癌又は脾癌に関する定性的又は定量的な指標とすることを意味する。ここで発現量とは、転写産物量、酵素タンパク質としての発現量、及び酵素活性の量のいずれをも含む概念であるが、転写産物量であることが好ましい。

【0077】体液、その中でも特に血液及びリンパ液中、特に好ましくは血液中に存在する微量の胃癌又は脾癌由来の細胞における α 4GnTのDNAの発現量を検出することで胃癌又は脾癌の検出を行うことができる。特に健康人の血液中には α 4GnTのDNAを発現した細胞が存

在しないため、血液中の $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの発現、好ましくは転写産物の検出が最も胃癌又は膵癌の検出に有用である。

【0078】 $\alpha 4\text{GnT}$ の活性の測定方法は例えばJ. Biol. Chem. 274, 3215-3221に記載された方法に準じて行うことができ、特にEDTAなどのキレート剤を反応混合液に添加せずに、 Mn^{2+} を添加することが好ましい。また、受容体としては特にGal β 1, 3GalNAc α pNP、GlcNAc β 1, 6(Gal β 1, 3)GalNAc α pNP、Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 6(Gal β 1, 3)GalNAc α pNP、Gal β 1, 4Glc β pNP、Gal β 1, 3GlcNAc β pNP 等が挙げられ、好ましい。

【0079】また、より簡便に操作を行うことができる上述の胃癌又は膵癌の検出法としては $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの転写産物を検出する方法が挙げられる。なお、 $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの転写産物量は一般に極微量であるので、これを逆転写してcDNA (又はその一部) を調製し、これをPCRによって大量に増幅して、増幅されたPCR産物を検出することにより、 $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの転写産物を間接的に検出することが好ましい。この方法としては、例えば配列番号7及び8、並びに/又は、配列番号9及び10の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーと、常法に従って体液中の細胞から調製した全RNAを逆転写して調製したcDNAとを用いてPCR法を行い、増幅されたPCR産物を電気泳動などの方法により分離して公知の方法に従って可視化することで $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの転写産物を、その逆転写物であるcDNA (又はその一部) を介して間接的に検出する方法が例示される。上記プライマーは本発明DNAが有する塩基配列 (配列番号1) のうちの通常には150bp以上、好ましくは200bp以上、より好ましくは250bp以上をPCR法によって増幅するためのプライマーであり、かつ好ましくはジェノミックDNAを増幅しない限りにおいて特に限定されず、上記に例示した塩基配列を有するプライマー以外でも、本発明DNAの塩基配列が開示されているため当業者であれば適宜設計することが可能であり、また市販のプライマー設計用のソフトウェア等を使用することで容易に設計することが可能である。例えば配列番号7及び8の塩基配列を有するポリヌクレオチドを用いてPCR法により $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの転写産物の逆転写物であるcDNAの一部を増幅した場合には、生じるPCR産物は290bpのポリヌクレオチドであり、配列番号9及び10の塩基配列を有するポリヌクレオチドを用いてPCR法により $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの転写産物の逆転写物であるcDNAの一部を増幅した場合には270bpのPCR産物が得られる。

【0080】更に上述の可視化した電気泳動像を市販の画像解析ソフトウェアを用いて解析することで、 $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの転写産物を、その逆転写物であるcDNA又はその一部 (増幅したもの) を定量することにより間接的に定量することも可能であり、特に血中に侵入した胃癌又は膵癌細胞の量を定量して上記胃癌又は膵癌の進行度、

転移の有無、治癒の程度などの指標とすることも可能である。

【0081】例えば、実施例7に記載の方法に従って、末梢血中に存在する胃癌又は膵癌由来の細胞中に存在するmRNAから、 $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの転写産物であるmRNAを逆転写PCR法によってcDNA又はその一部として増幅して胃癌及び膵癌を検出する場合は、例えば5mlの末梢血から回収した全RNAを逆転写してcDNAを調製し、これを鋳型として、配列番号7及び8のヌクレオチドプライマーとAmpli Taq Goldポリメラーゼ (パーキンエルマー (Perkin-Elmer) 製) を用いてPCR反応を行う。すなわち、最初に95℃で10分間加熱してポリメラーゼを活性化した後、変性反応を94℃で30秒、アニーリングを60℃で30秒、伸長反応は72℃で30秒としてこのサイクルを50サイクル行い、さらに5分間の伸長反応を行う。この操作によって生じたPCR産物を鋳型としてさらに配列番号9及び10のヌクレオチドプライマーを用いてPCR反応を行う。このときの増幅も1回目のPCRと同じ条件である。この操作によって $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの転写産物の逆転写物 (cDNA) 又はその一部を増幅することができる。この場合は、健康人では約270bpの増幅産物 (PCR産物) は検出されないのに対し、胃癌又は膵癌の患者では検出可能となる。例えばアガロースゲル電気泳動をした後にエチジウムブロマイドで染色した後に紫外線を照射することで、肉眼により確認することができる顕著なバンドが観察される。

【0082】また、 $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの転写産物を検出する方法の別の態様としては、放射性同位体等の検出可能な標識物質により標識を行った $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAと、体液中の $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの転写産物又はそれを増幅して調製した複製物とのハイブリダイゼーションを行い、上記標識物質を検出する方法が挙げられる。標識物質として放射性同位体を用いた場合は、検出はオーラジオグラフィ等によって容易に行うことができる。標識を行った $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAとして具体的には ^{32}P ラベルされた本発明DNA又はその断片を用いることが可能である。ハイブリダイゼーションはノザンハイブリダイゼーションなどで通常に用いられる条件で行うことができ、検出も常法に従って容易に行うことが可能である。

【0083】＜6＞本発明診断キット

更に本発明は $\alpha 4\text{GnT}$ をコードするDNAの発現を検出するために使用するオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする胃癌又は膵癌の診断キットも提供する。

【0084】上記の通り、 $\alpha 4\text{GnT}$ の体液中での発現は、胃癌又は膵癌であることを特異的に示すため、当該DNAの発現を検出するためのキットを構成すれば、これを用いて胃癌及び膵癌のいずれかであることが検出できる。本発明診断キットは、 $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの発現を簡便な手法により検出するために、 $\alpha 4\text{GnT}$ のDNAの転写産物を検出可能なオリゴヌクレオチドを含む限りにおいて特に限定されない。

【0085】上記オリゴヌクレオチドとしては、ハイブリダイゼーション法による検出に用いるための、標識物質により標識した本発明DNA又はその一部分、または逆転写PCR法による検出に用いるための、例えば配列番号7及び8の組み合わせ、並びに、配列番号9及び10の組み合わせのプライマー対が例示される。本発明DNAの一部分とは、配列番号1に示す塩基配列を有するDNAの一部分を指称し、その大きさは通常には150bp以上、好ましくは200bp以上であり、250bp以上であることが最も好ましい。また、上述のオリゴヌクレオチドが上述のプライマーである場合は、 α 4GnTのDNAの転写産物から、その一部分、好ましくは150bp以上、より好ましくは200bp以上、最も好ましくは250bp以上の一部分を増幅するためのオリゴヌクレオチドからなるプライマーで、かつ好ましくはジェノミックDNAを増幅しないものであれば上述のプライマーに限定されない。

【0086】本発明診断キットは、上述のオリゴヌクレオチドとして上述したプライマーを包含する場合は、当該プライマーの他に、更に胃癌又は肝癌の疑いのある組織から抽出した全RNA又は体液より抽出した全RNAから、 α 4GnTのDNA又はその塩基配列のうちの通常には150bp以上、好ましくは200bp以上、より好ましくは250bp以上からなる一部分を増幅するための試薬を包含しても良い。そのような試薬としては、RNAからDNAを逆転写反応により合成する逆転写酵素、及び前記逆転写反応によって生じたDNAを鋳型として相補的塩基配列を有するポリヌクレオチドを合成するためのDNAポリメラーゼが例示される。さらにこの場合、本発明診断キットは上述の試薬の他に、例えばマイクロチューブ、RNAase阻害剤、緩衝液、精製水、アガロースゲル、エチジウムブロマイド等を適宜含んでも良い。

【0087】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に詳述するが、本発明はこれに限定はされない。

【0088】1. 本発明酵素を発現する細胞のスクリーニング

真核細胞の発現ベクターであるpcDNAIに組み込んだヒトの胃組織のcDNAライブラリー（クロンテック社製）30 μ gを、ヒトのロイコシアリンを発現するpRcCMV-leu 30 μ gと共に 1.2×10^7 個のCOS-1細胞に導入した。このCOS-1細胞を60時間培養した後、細胞の表面に、糖鎖の非還元末端に α 結合で結合したGlcNAc残基を発現したCOS-1細胞を、ベクトンディッキンソン社製のセルソーター(FACStar)及び α 結合したGlcNAcと特異的に反応する抗体混合液（HIK1083、PGM36、及びPGM37(Biochem. J. 318, 409-416, 1996, Comp. Biochem. Physiol. 121B, 315-321, 1998)からなる）を使用した蛍光活性化セルソーティング(FACS)により濃縮し、258個のCOS-1細胞を回収した。

【0089】その後、常法に従ってプラスミドDNAを回

収し、Cell-Porator（ライフテクノロジー社製）を用いて宿主菌であるE. coli MC1061/P3に導入した。導入した宿主菌のうち、目的のcDNAを含む宿主菌をアンピシリン及びテトラサイクリンに対する耐性による選択で、325個のコロニーが生じた。

【0090】325個のコロニーをニトロセルロース膜に転写してレプリカを作成し、このレプリカを10等分してブールし、それぞれのブールからプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドDNAを再度、pRcCMV-leuと共にCOS-1細胞に導入し、上述の抗体混合液を使用した免疫蛍光染色を行い、その後、顕微鏡によりCOS-1細胞を観察した。その結果、強い蛍光を発するCOS-1細胞の存在が確認され、対応するレプリカを介して目的のcDNAを保持したコロニーが存在するホストを特定した。

【0091】さらに、この特定されたホストから新たなレプリカを上記と同様に作成して、上記と同様に目的のcDNAを保持するホストを絞り込んだ。レプリカの作成～ホストの絞り込みを3回繰り返して行った時点で、ホストに存在するコロニーが1つとなった。このコロニーを形成した宿主菌が保持していたプラスミドをpcDNAI- α 4GnTと名付けた。

【0092】2. 塩基配列の決定

1. で絞り込まれた宿主菌のコロニーから常法に従ってプラスミドDNAを回収して、常法によりアプライドバイオシステムズ社製の373A DNAシーケンサーを使用したダイジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション(dye dideoxy nucleotide chain-termination)法によって3'→5'、5'→3'双方の向きに塩基配列の解析を行った。その結果、この宿主菌に組み込まれているプラスミドDNAには1292bpの塩基対からなる配列番号1記載の塩基配列を有する α 4GnTのcDNAが挿入されていたことが明らかとなった。この塩基配列のオープンリーディングフレームから340アミノ酸残基からなるアミノ酸配列（配列番号2）が予測された。

【0093】このアミノ酸配列からは、分子量が39,497Daで、N-結合型糖鎖が結合する可能性がある4カ所の部位（配列番号2においてアミノ酸番号99、138、251及び282）を有するタンパク質が予測された。また、このアミノ酸配列から作成したハイドロパシープロット（図1）から、N末端から4～25番目のアミノ酸残基に渡る長さ22残基の連続した1つの顕著な疎水性部分が認められ、その部分のN末端側が短く、その部分が塩基性アミノ酸残基により挟まれていることから、 α 4GnTは、膜貫通領域を有するタイプIIの膜貫通タンパク質であることが予想された。

【0094】3. α 4GnTのCOS-1細胞における発現

1. で得られた宿主菌のコロニーからプラスミドベクターpcDNAI- α 4GnTを常法に従って調製した。このプラスミドベクター又はpcDNAI（対照）を、pRcCMV-leuと共にCOS-1細胞に導入した。同様に、COS-1細胞にpcDNAI- α 4

GnTを単独で導入した。導入60時間後、各細胞を固定し、 α 結合したGlcNAcと特異的に反応する抗体HIK1083又は抗ロイコシアリン抗体1G10 (PharMingen) と反応させ、次いで、フルオレセインイソチオシアネートを結合させた抗マウス IgM (HIK1083に対して) 又は抗マウス IgG (1G10に対して) と反応させた。

【0095】 pRcCMV-leu及びpcDNAIを導入したCOS-1細胞は、1G10により免疫染色されたがHIK1083により染色はされなかった。pRcCMV-leu及びpcDNAI- α 4GnTを導入したCOS-1細胞は、1G10及びHIK1083のいずれによっても免疫染色された。また、pcDNAI- α 4GnTのみを導入したCOS-1細胞は、1G10により染色されず、HIK1083では、弱い染色性が見られた。このことはHIK1083がクラスター0-グリカンに付加された α 1,4-GlcNAcに、より強く結合することを示唆している。PGM36及びPGM37のそれぞれによって免疫染色をした場合も、HIK1083で免疫染色した場合と同様の染色性が見られた。

【0096】 これらの結果から、pcDNAI- α 4GnTにコードされるタンパク質が、ロイコシアリン上にあるムチン型糖鎖の非還元末端にGlcNAcを α 結合により付加する活性に関与していることが示された。

【0097】 4. α 4GnTの部分配列を有する可溶性形態の α 4GnTをコードするDNAの調製
塩基配列から予測された α 4GnTのアミノ酸配列から、 α 4GnTはタイプIIの膜タンパク質であることが予測されたため、膜貫通領域を欠失した可溶性形態の α 4GnT (以下「 α 4GnT(S)」とも記載する) を調製した。すなわち、配列番号2記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号1~27に相当するN末端領域のアミノ酸を欠失した、配列番号2のアミノ酸配列においてアミノ酸番号28~340のアミノ酸配列を有する α 4GnT(S)を得るために、配列番号3記載の塩基配列を有するプライマーを上流域プライマー (BamHIサイトを内部に有する)、配列番号4記載

表 1

	受容体合成基質	入手方法
1	Gal α pNP	シグマ社より購入した。
2	Gal β pNP	
3	Gal β 1,3GlcNAc β pNP	
4	Gal β 1,4Glc β pNP	
5	GalNAc α pNP	
6	Gal β 1,3GalNAc α pNP	トロントリサーチケミカルズ社より購入した。
7	GlcNAc β 1,3GalNAc α pNP	
8	GlcNAc β 1,6(Gal β 1,3)GalNAc α pNP	J.Biol.Chem.273,34843,1998に従って、8を使用して合成した。
9	Gal β 1,4GlcNAc β 1,6(Gal β 1,3)GalNAc α pNP	

【0101】 図2に示されるように、 α 4GnT(S)はコア2の分岐オリゴ糖であるGal β 1,4GlcNAc β 1,6(Gal β 1,3)GalNAc α pNP (表1、No. 9) に対して、GlcNAcを転移する活性が最も強いことが明らかとなった。また、 α 4GnT(S)はコア1の受容体合成基質であるGal β 1,3GalNAc α pNP (表1、No. 6) よりも、よりGlcNAc β 1,6(Gal β

の塩基配列を有するプライマーを下流域プライマー (XhoIサイトを内部に有する) として用いて、pcDNAI- α 4GnTを鋳型としてPCR法を行った。得られたPCR産物を制限酵素BamHI及びXhoIにより消化処理し、配列番号1記載の塩基配列において塩基番号262~1215の塩基配列を有するDNAを調製した。プロテインAをコードするDNAを組み込んだpcDNAIプラスミドベクター (pcDNAI-A) (J. Biol. Chem. 274, 3215-3221, 1999) のBamHI-XhoIサイトに上述の塩基番号262~1215の塩基配列を有するDNAを組み込みpcDNAI-A- α 4GnT(S)を得た。このプラスミドベクターは α 4GnT(S)とプロテインAとを同一読み出し領域にコードしているため、 α 4GnT(S)とプロテインAとの融合タンパク質 (α 4GnT(S)-A) を発現する。

【0098】 5. α 4GnT(S)の精製及び基質特異性試験
常法に従って、COS-1細胞にpcDNAI-A- α 4GnT(S)を導入し、その培養上清から α 4GnT(S)-Aを、J. Biol. Chem. 274, 3215-3221, 1999に記載の方法と同様にIgG-Sepharoseカラム (アマシャムファルマシア社製) を使用して単離した。

【0099】 基質特異性試験はJ. Biol. Chem. 274, 3215-3221, 1999に記載された基質特異性試験の方法に準じて行ったが、10 mMのEDTAにより本発明酵素の活性は約2/3に抑制された。更にEDTAを添加せずに5 mMのMn²⁺を加えることで本発明酵素の活性は約1.3倍に促進されたため、前記方法において、反応液を、EDTAの代わりに5 mMのMnCl₂を含む反応液に代えた方法で、表1に記載された受容体合成基質をN-アセチルグルコサミンの受容体として使用して α 4GnT活性の測定を行った。表1の受容体合成基質No. 9に対する活性を100%として他の基質に対する相対活性で表した結果を図2に示す。

【0100】

【表1】

1,3)GalNAc α pNP (表1、No. 8) に対してGlcNAcを転移する活性が強いことを示す結果が得られた。

【0102】 α 4GnT(S)はGal β 1,4Glc β pNPと比較してGal β 1,3GalNAc α pNP (表1、No. 6) に対してよりGlcNAcを転移するが、さらにGlcNAc β 1,6(Gal β 1,3)GalNAc α pNP (表1、No. 8) 及びGal β 1,4GlcNAc β 1,6(Gal β 1,

3) GalNAc α pNP (表 1、No. 9) に対して GlcNAc を転移する活性が強い。また、Gal β 1, 3GlcNAc β pNP (表 1、No. 3) 及び Gal β 1, 4Glc β pNP (表 1、No. 4) に GlcNAc を転移する弱い活性を有した。このことから主には α 4GnT (S) は O-グリカン中の β 1, 4 結合及び β 1, 3 結合で結合したガラクトース残基を認識して GlcNAc を転移すると推測された。また α 4GnT (S) は、糖供与体として UDP-GalNAc を使用した場合は、上記のいずれの受容体合成基質に対しても糖 (GalNAc) を転移しなかった。

【0103】 α 4GnT (S) の GlcNAc 転移活性によって生じた生成物の構造を特定するために、上述の条件において反応液を 300 μ l にスケールアップし、一晚反応させて得られた反応生成物を、Sep-Pak C18 カートリッジカラムを使用して、J. Biol. Chem. 273, 34843-34849, 1998 に記載された方法に従って精製した。反応生成物の純度が 99% 以上であることを HPLC により確認した後、常法に従って NMR により構造を分析した。NMR スペクトルの解析は 500 MHz Varian Unity-Plus スペクトロメーターを用いた。ケミカルシフトの帰属には受容体および α -D-GalNAc-pNP、Gal β 1, 3GalNAc-pNP 及び Gal β 1, 3 (GlcNAc β 1, 6) GalNAc-pNP のスペクトルの全てを用いた。スペクトルは繰り返し重水置換を行った後に重水を溶媒として測定した。 1 H NMR のスペクトルは、二次元二量子フィルター相関スペクトル (2D-DQF-COSY) と、二次元全相関スペク

表 2

結	H-1	C-1	H-2	C-2	H-3	C-3	H-4	C-4	H-6	C-6
α -D-GalNAc	5.8 (3.5Hz)	97.5	4.6	49.7	4.35	78.0	4.25	70.5	3.57	--
2x α -D-GlcNAc	4.87 (3.5Hz)	99.8	3.89	54.7	3.78	71.8	3.54	70.2	--	--
	4.88 (3.5Hz)	99.9								
2x β -D-Gal	4.59 (7Hz)	105.5	3.56	71.2	3.72	72.1	3.96	78.3	--	--
	4.42 (8Hz)	104.9	3.58		3.70		3.95			
β -D-GlcNAc	4.44 (8Hz)	102.5	3.56	56.0	3.62	71.8	3.74	76.2	--	--

--は測定せず。

【0106】 6. 各組織での α 4GnT 発現

6-1 ノザンブロット分析

pcDNAI- α 4GnT から切り出してゲル電気泳動で単離した α 4GnT の cDNA を、ストラタジーン社製の Prime-It II ラベリングキットを使用して [α 32 P]dCTP でラベルして放射性プローブを作成した (1×10^6 cpm/ml)。上記プローブを、クロンテック社製のヒト多組織ノザンブロット用 (健康成人組織) メンブラン (Multiple Tissues Northern Blots) 及びクロンテック社製のハイブリダイゼーション溶液 (ExpressHyb Hybridization Solution) を用い、キットに添付された手順書に従って分析を行った。すなわち、ExpressHyb Hybridization Solution を 68℃ に加熱し、Multiple Tissues Northern Blots を 68℃ で 30 分間、上記 ExpressHyb Hybridization Solution 中で振

トル (2D-TOCSY: 50 ms) を組み合わせて帰属した。精度を上げるためにスペクトル解析は 5℃、22℃、及び 30℃ で行った。 13 C の帰属とグリコシド結合は、異核多重量子コヒーレンススペクトル (HMQC) 及び二次元回転機構 NOE スペクトル (2D-ROESY: 150ms 及び 300ms) を補助的に使用して決定した。

【0104】 300 ナノモルの Gal β 1, 4GlcNAc β 1, 6 (Gal β 1, 3) GalNAc α pNP を受容体として α 4GnT (S) の活性により GlcNAc を転移させた反応生成物を使用して NMR による構造解析を行った。 1 H NMR のスペクトルから、表 2 に示すように、6 個のアノマーの原子について二重線の特異的シグナルが得られた。非アノマープロトンのシグナルは、2D-DQF-COSY 及び 2D-TOCSY スペクトルの H-4 の位置に観察されたクロスピークに基づいて帰属された。 13 C NMR のスペクトルは、反転モードを使用した二次元水素検出異核 1 H- 13 C 相関によって解析した。HMQC スペクトルにより、 β -D-Gal 残基の 4 位の炭素原子は置換が起きていることが示された。2D-ROESY スペクトルでは、 α -D-GlcNAc H-1 / β -D-Gal H-4 の δ 3.96ppm 付近のクロスピークが観察され、それが α 1, 4 結合により結合していることが示された。スペクトル中の他のクロスピークも、Gal に GlcNAc が α 1, 4 結合で結合した構造に合致した。

【0105】

【表 2】

盪してプレハイブリダイズを行った。上記プローブを 95℃ で 2 分間変性させて急冷し、その後このプローブを含む ExpressHyb Hybridization Solution 5 ml 中で上記 Multiple Tissues Northern Blots を 68℃ で 1 時間振盪した。この膜を洗浄液中で 30 分間室温で振盪し、さらに 50℃ で 40 分間洗浄液中で振盪した。このように調製した放射性プローブが結合した Multiple Tissues Northern Blots を用いてオートラジオグラフィーにより X 線フィルムを感光させた。その結果、1.7kb の大きさの α 4GnT 遺伝子の転写産物が、胃及び脾臓において観察された。さらに 2.1kb 及び 0.7kb の転写産物が胃及び脾臓にかすかに観察された。

【0107】 6-2 GlcNAc α 1, 4Gal β \rightarrow R 構造又は III 型粘液の組織での発現

ヒト組織でのGlcNAc α 1,4Gal β →R構造の発現を検出するために、Histochem. Cell Biol. 110, 113-119, 1998 及び J. Histochem. Cytochem. 46, 793-801, 1998 に記載された方法に従って、HIK1083抗体を使用した免疫染色法を行った。すなわち、信州大学医学部附属病院の病理切片ファイルから選択された、ホルマリン固定された後にパラフィン包埋されたヒト健常組織試料(胃、脾臓、及び結腸)を0.3%の過酸化水素水を含む無水メタノールに30分間つけた。HIK1083抗体による免疫組織染色は間接染色法(Ann. NY Acad. Sci. 254, 203-211, 1975)を使用した。二次抗体としては西洋ワサビのペルオキシダーゼ(ダコ社製)を結合したヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体を使用し、ジアミノベンジジン-過酸化水素水溶液を使用して発色させた。胃粘膜においては副細胞及び幽門腺細胞に、脾臓においては脾管周囲の付属腺及び胃粘膜化生を示した腺管上皮に強い染色像が観察され、これらの部位においてGlcNAc α 1,4Gal β →R構造が強く発現していることが示された。結腸においては染色像は観察されなかった。対照として一次抗体を使用しないで染色を行ったが、非特異的な染色は観察されなかった。

【0108】また、上記と同様の組織におけるIII型粘液を検出するために、J. Histochem. Cytochem. 26, 233-250, 1978に記載された方法でコンカナバリンAパラドックス染色を行った。すなわちホルマリン固定した上記組織検体を60分間1%過ヨウ素酸ナトリウム水溶液中で酸化処理し、その後2分間0.2%水素化ホウ素ナトリウム水溶液で還元処理した。洗浄後、検体を0.1%コンカナバリンA(シグマ社製)中で60分間室温で処理し、その後0.001%西洋ワサビペルオキシダーゼ溶液に30分間浸した。ペルオキシダーゼ活性はジアミノベンジジン-過酸化水素水溶液を使用して発色させて検出した。

【0109】上述のHIK1083抗体による染色像と、コンカナバリンAパラドックス染色による染色像は酷似しており、非還元末端部に α 1,4結合したGlcNAc残基はコンカナバリンAパラドックス染色で検出されるIII型粘液に含まれているものと考えられた。

【0110】7. 胃癌及び脾癌における本発明酵素DNAの転写産物の検出

胃癌患者29人から末梢血5mlを採取した。採取した末梢血に比重液3mlを添加し、室温において2000×gで遠心処理を行い、単核球層だけを回収した。ここから酸性グアニジンチオシアネートフェノールクロロホルム法に従って調製した全RNAを逆転写反応の鋳型として、オリゴdTをプライマーとしてcDNAの一本鎖を合成し、これをPCRの鋳型として使用した。PCRは、8 pmoleのプライマーs(配列番号7:5'プライマー)及びa(配列番号8:3'プライマー)の混合物、それぞれ200 μ Mの4種類のデオキシヌクレオチド三リン酸、及び0.35 UのAmpliTaq Goldポリメラーゼ(パーキンエルマー(Perkin-Elme

r)製)を含む混合液10 μ lで行った。増幅は以下のように行った。はじめに95℃で10分間加熱しポリメラーゼを活性化した。次に変性反応を94℃で30秒、アニーリングを60℃で30秒、伸長反応を72℃で30秒とし、このサイクルを50サイクル行った。その後、さらに5分間伸長反応を行った。この操作によって生じたPCR産物1 μ lを鋳型として用いて2度目のPCR反応を行った。このとき用いたプライマーは配列番号9(5'プライマー)及び配列番号10(3'プライマー)のものであり、増幅は1回目のPCRと同じ条件で行った。この操作によって生じたPCR産物を3%のアガロースゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロマイドで染色して解析し、増幅されたDNAのバンド(270 bp)を検出した。

【0111】その結果、17名の胃癌患者の血液からは肉眼で確認できる程度のバンドが観察されたのに対し、対照として用いた10名の健常人の末梢血を用いて調製したPCR産物においてはこのバンドは全く観察されなかった。同様に、5名の脾癌患者の末梢血から調製したPCR産物からも4例で胃癌患者と同じバンドが観察された。しかし、他の臓器(例えば食道、大腸、肺、肝臓)の癌の患者の末梢血からのPCR産物ではこのバンドは観察されなかった。また、胆嚢及び胆管の癌においてもGlcNAc α 1,4Gal β 残基を発現していることが知られているので、胃癌及び脾癌と同様に本発明検出法により検出が可能であることが予測された。

【0112】これらのことから、体液中における α 4GnTのDNAの転写産物を、その逆転写物を介して検出することで、胃癌及び脾癌の特異的な検出を行うことが可能であることが明かとなった。

【0113】8. GlcNAc α 1,4Gal β →R構造を発現するAGS細胞の確立

ヒト胃ガン由来のAGS細胞(ATCC: CRL-1739)は2種類の異なるコア2 β 1,6-N-アセチルグルコサミン転写酵素(C2GnT-M: J. Biol. Chem. 274, 3215-3221, 1999、及びC2GnT-L: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9326-9330, 1992)の転写産物を発現しているが、細胞表面には、糖鎖の非還元末端に α 1,4結合で結合したGlcNAc残基は発現していないことが知られている。

【0114】1. で得られた細胞群から常法に従って調製したプラスミドDNA(pcDNAI- α 4GnT)をpSV2neo(クロンテック社製)と共に10:1のモル数比となるようにLipofectAMINEを使用して常法に従ってAGS細胞に導入した。対象として α 4GnTの塩基配列を保持していないプラスミドベクターpcDNAIを使用した。ネオマイシン(G418)によりプラスミドベクターを導入したAGS細胞を選択した後、細胞表面にGlcNAc α 1,4Gal β →R構造を発現している細胞を、HIK1083抗体を用いた蛍光抗体染色によって選択した。選択された細胞をヌンク社製のLab-Tekチャンパーズスライドを用いて培養した。一層状に広がったAGS細胞を、HIK1083抗体により免疫染色した。この結

果、GlcNAc α 1,4Gal β →R構造の発現が蛍光色素により観察された。この細胞を6-2同様にコンカナバリンAパラドックス染色を行った結果、III型粘液が検出された。pcDNAI- α 4GnTを導入していない対照のAGS細胞はHI K1083を使用した免疫染色、及びコンカナバリンAパラドックス染色のいずれにも染色性を示さなかった。

【0115】この結果は、 α 4GnTで合成されたGlcNAc α 1,4Gal β →R構造がコンカナバリンAパラドックス染色で検出されることを示した。

【0116】9. α 4GnTの染色体上の位置決定
本発明DNAの染色体上の位置決定を、PCR法を利用するスタンフォードG3ラジエーションハイブリッドパネル (Nat. Genet., 7., 22-28, 1994) を使用して、J. Biol. Chem., 274, 3215-3221, 1999に記載された方法に従って行った。ラジエーションハイブリダイゼーションDNAクローン (83個のエッペンドルフチューブに入ったクローン) はリサーチジェネティクス社より購入し、 α 4GnTの上流プライマー及び下流プライマーとしては、配列番号5及び6を使用した。PCR法は、95℃で

10分間、DNAを変性し、続いて、94℃30秒、60℃30秒、及び72℃23秒からなるサイクルを30回繰り返し、最後に72℃に3分30秒保って行った。増幅産物は、3.0%アガロースゲル電気泳動を行い、放射能を有するバンドを検出した。83のハイブリッドクローンのうち、No. 7、17、41、43、44、47、68、77、78、82のクローンにおいてバンドが検出され、スタンフォードヒトゲノムセンターのRHサーバーにおいて解析した結果、 α 4GnTはヒト第3染色体のD3S1569及びD3S1550の間に位置することが判明した。すなわち、ヒト α 4GnTの染色体上の位置は3p14.3であることが判明した。

【0117】

【発明の効果】本発明により、これまで入手することが不可能であった酵素の遺伝子工学的な大量合成が可能となる。また当該酵素によりGalに α 1,4結合でGlcNAcが結合した構造を有する糖鎖を合成することが可能となる。さらに、胃癌又は膵癌の特異的な検出が可能となる。

【0118】

【配列表】

<110> 生化学工業株式会社

<120> N-アセチルグルコサミン転移酵素及びそれをコードするDNA

<130> P-6965

<150> JP 11-157190

<151> 1999-06-03

<160> 10

<210> 1

<211> 1292

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (181).. (1200)

<400> 1

```

gttaactgca ttgcagcta gaagtttagc tctgattcac tgtttgtat ttctaaaag 60
ggttatatgt aatttgaaag atagacctgc caagacgtga gatctgtgt ctccttggtt 120
agagctaaca tttttggtga ggaaagcact gcaggagcag gctggcacag agaagaggac 180
atg cgg aag gag ctc cag ctc tcc ctg tca gtc acc ttg ctg ctt gtc 228
Met Arg Lys Glu Leu Gln Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Leu Leu Val
      1           5           10           15
tgt ggc ttc ctc tac cag ttc acc ctg aag tcc agc tgc ctc ttc tgt 276
Cys Gly Phe Leu Tyr Gln Phe Thr Leu Lys Ser Ser Cys Leu Phe Cys
      20           25           30
ttg cct tct ttc aag tcc cac cag ggg ctg gaa gcc ctc ctg agc cac 324
Leu Pro Ser Phe Lys Ser His Gln Gly Leu Glu Ala Leu Leu Ser His
      35           40           45
aga cgt ggc att gtg ttt cta gag acc tca gag aga atg gag cca ccc 372
Arg Arg Gly Ile Val Phe Leu Glu Thr Ser Glu Arg Met Glu Pro Pro
      50           55           60
cat ttg gtc tcc tgt tcc gta gag tct gct gcc aag att tat cct gag 420

```

31																	32
His	Leu	Val	Ser	Cys	Ser	Val	Glu	Ser	Ala	Ala	Lys	Ile	Tyr	Pro	Glu		
65					70					75					80		
tgg	cct	gtg	gtg	ttc	ttt	atg	aag	ggt	ctt	act	gat	tcc	aca	ccg	atg	468	
Trp	Pro	Val	Val	Phe	Phe	Met	Lys	Gly	Leu	Thr	Asp	Ser	Thr	Pro	Met		
				85					90					95			
ccc	tca	aac	tcc	aca	tac	cca	gct	ttt	tcc	ttc	ctg	tca	gca	ata	gac	516	
Pro	Ser	Asn	Ser	Thr	Tyr	Pro	Ala	Phe	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Ile	Asp		
				100				105					110				
aac	gtt	ttc	ctc	ttc	cct	ttg	gat	atg	aaa	agg	ctg	ctt	gaa	gac	aca	564	
Asn	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Leu	Asp	Met	Lys	Arg	Leu	Leu	Glu	Asp	Thr		
				115				120					125				
cca	ttg	ttt	tca	tgg	tac	aat	caa	atc	aac	gcc	agc	gca	gag	aga	aac	612	
Pro	Leu	Phe	Ser	Trp	Tyr	Asn	Gln	Ile	Asn	Ala	Ser	Ala	Glu	Arg	Asn		
				130				135					140				
tgg	ctc	cac	atc	agc	tcg	gat	gca	tcc	cgc	ctg	gcc	atc	atc	tgg	aaa	660	
Trp	Leu	His	Ile	Ser	Ser	Asp	Ala	Ser	Arg	Leu	Ala	Ile	Ile	Trp	Lys		
				145				150					155		160		
tac	ggt	ggc	atc	tac	atg	gac	acc	gat	gtc	atc	tcc	atc	agg	ccc	atc	708	
Tyr	Gly	Gly	Ile	Tyr	Met	Asp	Thr	Asp	Val	Ile	Ser	Ile	Arg	Pro	Ile		
				165				170					175				
cct	gag	gag	aac	ttt	ttg	gct	gcg	cag	gct	tct	cgg	tac	tct	agt	aat	756	
Pro	Glu	Glu	Asn	Phe	Leu	Ala	Ala	Gln	Ala	Ser	Arg	Tyr	Ser	Ser	Asn		
				180				185					190				
gga	ata	ttt	ggg	ttc	ctc	ccc	cac	cac	ccc	ttt	ttg	tgg	gaa	tgc	atg	804	
Gly	Ile	Phe	Gly	Phe	Leu	Pro	His	His	Pro	Phe	Leu	Trp	Glu	Cys	Met		
				195				200					205				
gaa	aac	ttt	gtt	gaa	cac	tat	aat	tca	gcc	att	tgg	ggc	aac	caa	ggc	852	
Glu	Asn	Phe	Val	Glu	His	Tyr	Asn	Ser	Ala	Ile	Trp	Gly	Asn	Gln	Gly		
				210				215					220				
cct	gag	ttg	atg	aca	agg	atg	ttg	agg	gta	tgg	tgt	aaa	ctt	gaa	gac	900	
Pro	Glu	Leu	Met	Thr	Arg	Met	Leu	Arg	Val	Trp	Cys	Lys	Leu	Glu	Asp		
				225				230					235		240		
ttc	cag	gag	gtg	agc	gac	ctc	agg	tgt	ctg	aac	ata	tcc	ttc	tta	cac	948	
Phe	Gln	Glu	Val	Ser	Asp	Leu	Arg	Cys	Leu	Asn	Ile	Ser	Phe	Leu	His		
				245				250					255				
ccc	caa	aga	ttt	tac	ccc	atc	tcc	tat	cga	gag	tgg	agg	cgc	tac	tat	996	
Pro	Gln	Arg	Phe	Tyr	Pro	Ile	Ser	Tyr	Arg	Glu	Trp	Arg	Arg	Tyr	Tyr		
				260				265					270				
gaa																	

33
 cca ggt aac aaa taaagctaac actcgtttgc tgctgctgca gtgtggaaat 1240
 Pro Gly Asn Lys
 340
 ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1292
 <210> 2
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Arg Lys Glu Leu Gln Leu Ser Leu Ser Val Thr Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Cys Gly Phe Leu Tyr Gln Phe Thr Leu Lys Ser Ser Cys Leu Phe Cys
 20 25 30
 Leu Pro Ser Phe Lys Ser His Gln Gly Leu Glu Ala Leu Leu Ser His
 35 40 45
 Arg Arg Gly Ile Val Phe Leu Glu Thr Ser Glu Arg Met Glu Pro Pro
 50 55 60
 His Leu Val Ser Cys Ser Val Glu Ser Ala Ala Lys Ile Tyr Pro Glu
 65 70 75 80
 Trp Pro Val Val Phe Phe Met Lys Gly Leu Thr Asp Ser Thr Pro Met
 85 90 95
 Pro Ser Asn Ser Thr Tyr Pro Ala Phe Ser Phe Leu Ser Ala Ile Asp
 100 105 110
 Asn Val Phe Leu Phe Pro Leu Asp Met Lys Arg Leu Leu Glu Asp Thr
 115 120 125
 Pro Leu Phe Ser Trp Tyr Asn Gln Ile Asn Ala Ser Ala Glu Arg Asn
 130 135 140
 Trp Leu His Ile Ser Ser Asp Ala Ser Arg Leu Ala Ile Ile Trp Lys
 145 150 155 160
 Tyr Gly Gly Ile Tyr Met Asp Thr Asp Val Ile Ser Ile Arg Pro Ile
 165 170 175
 Pro Glu Glu Asn Phe Leu Ala Ala Gln Ala Ser Arg Tyr Ser Ser Asn
 180 185 190
 Gly Ile Phe Gly Phe Leu Pro His His Pro Phe Leu Trp Glu Cys Met
 195 200 205
 Glu Asn Phe Val Glu His Tyr Asn Ser Ala Ile Trp Gly Asn Gln Gly
 210 215 220
 Pro Glu Leu Met Thr Arg Met Leu Arg Val Trp Cys Lys Leu Glu Asp
 225 230 235 240
 Phe Gln Glu Val Ser Asp Leu Arg Cys Leu Asn Ile Ser Phe Leu His
 245 250 255
 Pro Gln Arg Phe Tyr Pro Ile Ser Tyr Arg Glu Trp Arg Arg Tyr Tyr
 260 265 270
 Glu Val Trp Asp Thr Glu Pro Ser Phe Asn Val Ser Tyr Ala Leu His
 275 280 285
 Leu Trp Asn His Met Asn Gln Glu Gly Arg Ala Val Ile Arg Gly Ser
 290 295 300
 Asn Thr Leu Val Glu Asn Leu Tyr Arg Lys His Cys Pro Arg Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Asp Leu Ile Lys Gly Pro Glu Gly Ser Val Thr Gly Glu Leu Gly

35			36
	325	330	335
Pro Gly Asn Lys			
340			
<210> 3			
<211> 28			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic DNA			
<400> 3			
cgggatccga gctgcctctt ctgtttgc			28
<210> 4			
<211> 32			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic DNA			
<400> 4			
ccgctcgagc gagtgttagc tttatttgtt ac			32
<210> 5			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic DNA			
<400> 5			
tgtgggaatg catggaaaac			20
<210> 6			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic DNA			
<400> 6			
agtgtgttgc ttctctaat c			21
<210> 7			
<211> 19			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Synthetic DNA			
<400> 7			
cgtagagtct gctccaag			19
<210> 8			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			

```
<223> Synthetic DNA
<400> 8
ccatgtagat gccaccgtat
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 9
tttatcctga gtggcctgtg
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic DNA
<400> 10
ccatgtagat gccaccgtat
```

20

20

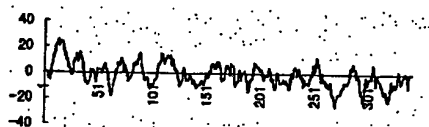
20

【図面の簡単な説明】

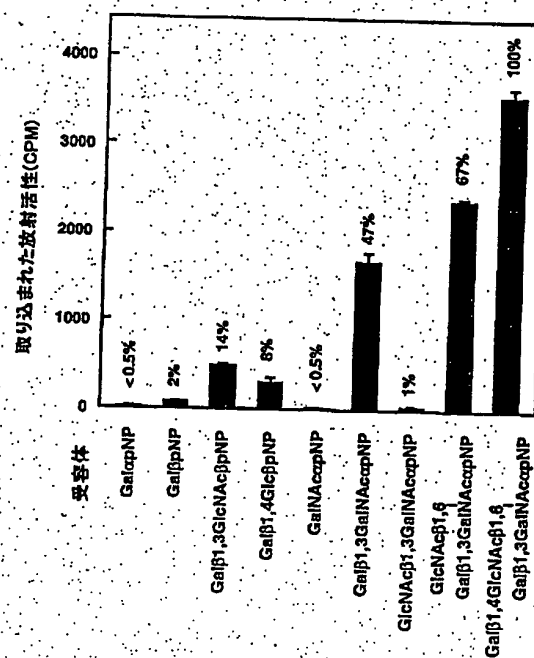
【図1】 配列番号2記載のアミノ酸配列から作成した
 ハイドロパシープロットである。

【図2】 実施例で得られたN-アセチルグルコサミン転移酵素の基質特異性を示す。

【図 1】



【图2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

ターマコード (参考)

C 1 2 R 1:91)

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA11 BA10 CA04 CA07
DA02 EA04 GA11 GA27 HA03
HA13 HA14
4B050 CC01 CC03 CC05 DD11 FF03E
FF14E LL01 LL03 LL05
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QQ42
QQ44 QQ52 QQ53 QR08 QR32
QR40 QR62 QS16 QS25 QX02
4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14
AC16 BA02 BA25 BD14 BD50
CA29 CA44 CA46

THIS PAGE BLANK (USPTO)